



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 48/00, 9/127	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/34648 (43) Date de publication internationale: 13 août 1998 (13.08.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00222</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 février 1998 (06.02.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/01467 10 février 1997 (10.02.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel Voisin, F-92330 Sceaux (FR). PITARD, Bruno [FR/FR]; 3, rue Gaston Lévy, F-92330 Sceaux (FR).</p> <p>(74) Mandataire: DERNONCOUR, Roxane; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: FORMULATION OF STABILISED CATIONIC TRANSFECTION AGENT(S)/NUCLEIC ACID PARTICLES</p> <p>(54) Titre: FORMULATION DE PARTICULES AGENT(S) DE TRANSFECTION CATIONIQUE(S)/ACIDES NUCLEIQUES STABILISEES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a composition containing stabilised particles of cationic transfection agent(s)/nucleic acid complexes characterised in that it includes besides said transfection agent and nucleic acid at least a non-ionic surfactant in sufficient amount for preventing the aggregation of the particles in course of time. In a preferred embodiment, the surfactant is a polyoxyalkylene or a derivative thereof.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne une composition comprenant des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques stabilisées caractérisée en ce qu'elle incorpore outre ledit agent de transfection et l'acide nucléique au moins un agent de surface non ionique en quantité suffisante pour prévenir l'aggrégation des particules au cours du temps. Selon un mode préféré de l'invention, l'agent de surface est ou dérive d'un polyoxyalkylène.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

FORMULATION DE PARTICULES AGENT(S) DE TRANSFECTION
CATIONIQUE(S) / ACIDES NUCLEIQUES STABILISEES

La présente invention se rapporte à des associations agent(s) de transfection cationique(s)/ADN dont les particules sont stabilisées en taille à l'aide d'un agent de surface non ionique et à leurs utilisations en thérapie génique.

De nombreuses maladies génétiques sont associées à un défaut d'expression et/ou une expression anormale, c'est à dire déficiente ou excessive, d'un ou plusieurs acides nucléiques. La thérapie génique a pour principal objectif de corriger ce type d'anomalies génétiques par le biais de l'expression cellulaire in vivo ou in vitro de gènes clonés.

Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont proposées pour la délivrance intracellulaire de ce type d'information génétique. L'une d'entre elles, en particulier, repose sur l'emploi de vecteurs chimiques ou biochimiques. Les vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, complexer l'ADN à transfecter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, à travers les deux membranes nucléaires. Parmi les vecteurs synthétiques développés, les polymères cationiques de type polylysine et DEAE dextran ou encore les lipofectants sont les plus avantageux.

Un progrès important a été accompli dans ce mode de transfection avec le développement d'une technologie basée sur l'emploi d'agents de transfection cationiques de type lipofectants et plus précisément de lipides cationiques. Il a ainsi été mis en évidence qu'un lipide cationique chargé positivement, le chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), interférait, sous la forme de liposomes ou de petites vésicules, spontanément avec de l'ADN, qui est chargé négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner

chargé négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permettait ainsi la délivrance intracellulaire de l'ADN.

Depuis le DOTMA, d'autres lipides cationiques ont été développés sur ce modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer". Parmi ceux-ci, on peut plus particulièrement citer ceux comprenant à titre de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement d'ammonium quaternaire.

Une autre catégorie de lipofectants, les lipopolyamines, a également été décrite. De manière générale, il s'agit d'une molécule amphiphile comprenant au moins une région hydrophile polyamine associée par une région dite spacer à une région lipophile. La région polyamine des lipopolyamines, chargée cationiquement, est capable de s'associer de manière réversible avec l'acide nucléique, chargé négativement. Cette interaction compacte fortement l'acide nucléique. La région lipophile rend cette interaction ionique insensible au milieu externe, en recouvrant la particule nucléolipidique formée d'une pellicule lipidique. Dans ce type de composés, le groupement cationique peut être représenté par le radical L-5carboxyspermine qui contient quatre groupements ammonium, deux primaires et deux secondaires. Les composés DOGS et DPPES en font notamment partie. Ces lipopolyamines sont tout particulièrement efficaces pour la transfection de cellules endocrines primaires. A titre représentatif de cette dernière famille de composés on peut plus particulièrement

faire état des lipopolyamines décrites notamment dans les demandes de brevet WO 96/17823 et WO 97/18185

Toutefois, l'efficacité de ces vecteurs synthétiques reste à améliorer notamment en terme de complexation avec l'acide nucléique et plus précisément sur le plan de la
5 stabilité des particules de ces complexes nucléolipidiques. En effet, avec les formulations classiques acides nucléiques/agent de transfection cationique, on assiste fréquemment et rapidement à un phénomène d'aggrégation des particules de complexes. De tels agrégats possèdent évidemment une taille difficilement compatible avec une transfection thérapeutique. Une des solutions proposées jusqu'ci
10 pour prévenir ce type de phénomène de précipitation, consiste à introduire dans la formulation, l'agent de transfection cationique, comme par exemple le lipofectant, en quantité excessive c'est à dire dans un rapport de charge lipofectant/acides nucléiques de l'ordre de 10 voire plus. Outre le fait qu'une telle solution n'est pas toujours efficace, elle n'est pas totalement satisfaisante sur le plan de l'innocuité. Les agent de
15 transfection cationiques comme les lipofectants et polymères cationiques sont en soit des composés qui, en quantités importantes, risquent de présenter une toxicité relative pour les cellules les incorporant.

Il serait donc particulièrement intéressant de disposer sur le plan thérapeutique de formulations agents de transfection cationiques/acides nucléiques possédant des
20 rapports de charges réduits et néanmoins stabilisées dans le temps sous la forme de particules non aggrégées. Or, comme cela est énoncé précédemment, les zones de concentrations acides nucléiques/lipofectants répondant à de tels rapports de charges sont généralement associées à un état physique instable. On assiste rapidement à un phénomène d'aggrégation des particules nucléolipidiques. Qui plus est, on sait
25 également que la présence d'un sel de type NaCl, classiquement mis en oeuvre dans

les formulations agents de transfection cationiques/acides nucléiques, peut induire à certaines concentrations, la précipitation des particules nucléolipidiques. Ainsi, la gamme de concentration en agent de transfection pour laquelle on observe la précipitation sera d'autant plus grande que la concentration en sel sera élevée.

- 5 La présente invention a précisément pour objectif de valoriser ces zones de concentrations agent de transfection cationique/acides nucléiques, intéressantes sur le plan de l'innocuité pour leurs quantités réduites en vecteur et également sur le plan interférence avec d'autres protéines compte tenu de leur charge réduite. En effet, lorsque les complexes sont relativement peu chargés, le risque qu'ils interfèrent avec
- 10 les protéines du sérum in vivo est significativement réduit. Ceci est bien entendu particulièrement avantageux pour le transfert d'acides nucléiques in vivo (Remy, J.S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92, 1744-1748). De nombreux articles font état de ce type d'interactions entre les protéines du sérum et des liposomes (Senior, J.H. et al. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1070, 173-179; Hernandez-Caselles, T et al.
- 15 Molecular and cellular Biochemistry 1993, 120, 119-126; Oku, N. et al. Biochim. Biophys. Acta 1996, 1280, 149-154). Des données ont également été publiées sur l'activation du système du complément par des complexes à base d'ADN utilisés pour la thérapie génique. Le degré d'activation du complément dépend du rapport cation/ADN (ou rapport de charge). Ce dernier phénomène est surtout vrai pour les
- 20 polycations comme les polylysines, les lipospermines (par exemple le DOGS). L'activation du complément est moins sensible au rapport de charge pour les ammoniums quaternaires comme le DOTAP, le DC-Chol, ou le DOTMA (Plank, C. et al. Human Gene Therapy 1996, 7, 1437-1446).

En conséquence, il serait particulièrement intéressant de disposer sur le plan

25 thérapeutique de formulations en complexes agents de transfection cationiques/acides

nucléiques à concentration élevée en acides nucléiques et/ou à des rapport de charge réduits voire proches de la neutralité et qui soient en outre stabilisées sous une forme fluide de type colloïdale c'est à dire non agrégées, deux spécificités apparemment naturellement inconciliables.

- 5 De manière inattendue, la demanderesse a mis en évidence que l'adjonction d'un agent de surface non ionique à des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques, naturellement instables c'est à dire susceptibles, d'évoluer rapidement vers la formation d'aggrégats, permettait de s'opposer efficacement à ce phénomène et donc de stabiliser les particules de complexes à une
- 10 taille de particule inférieure à ou de l'ordre de 160 nm.

La présente invention a pour premier objet une composition utile en thérapie génique comprenant des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques caractérisée en qu'elle incorpore en outre au moins un agent de surface non ionique en quantité suffisante pour stabiliser la tailles desdites particules à une

15 dimension inférieure ou égale à 160 nm.

Au sens de l'invention, on entend désigner par des particules stabilisées, des particules dont la taille n'est pas susceptible d'évoluer au cours du temps, lorsque notamment ces particules sont maintenues en dispersion dans une solution. Contrairement aux formulations classiques, c'est à dire exempt d'agent de surface non

20 ionique, les compositions revendiquées peuvent être conservées de manière plus prolongée dans le temps sans que puisse être notée une quelconque modification, de type aggrégation notamment, au niveau de cette dispersion. La taille des particules ainsi stabilisées évoluent généralement entre 50 et 160 nm, de préférence entre 75 et 150 nm.

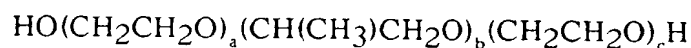
En l'absence de l'agent de surface non ionique revendiqué, les particules de complexes présentes dans la composition revendiquée, conduisent spontanément à des agrégats particuliers de taille supérieure à 160 nm.

5 Par ailleurs, la demanderesse a démontré que les compositions selon l'invention possède une structure lamellaire ayant alternativement des bicouches de lipides et des couches d'ADN intercalées.

Les agents de surface non ioniques, conformes à la présente invention, possèdent de préférence au moins un segment hydrophobe et au moins un segment hydrophile. La partie hydrophobe peut être aussi bien une chaîne aliphatique, un polyoxyalkylène, un polyester d'alkylidène, un polyéthylène glycol à tête polyéther benzylique
10 dendritique, ou le cholestérol. Quant à la partie hydrophile, il peut s'agir d'un polyoxyalkylène, d'un alcool polyvinyle, d'un polyvinylpyrrolidone, ou d'un saccharide.

De manière préférée, l'agent de surface mis en oeuvre dans le cadre de la présente
15 invention est ou dérive d'un polyol non ionique et plus particulièrement d'un polyoxyalkylène avec des groupements alkylène de longueurs et/ou de conformations différentes ou non, au sein du polymère.

Plus préférentiellement, il répond à la formule générale suivante :



20 avec a, b et c représentant indépendamment l'un de l'autre des nombres entiers pouvant varier entre 20 et 100 inclusivement.

L'agent non ionique est de préférence présent dans les compositions selon l'invention à une concentration comprise entre 0,01% à 10% poids/volume de ladite composition et plus préférentiellement entre 0,02% et 5% poids/volume.

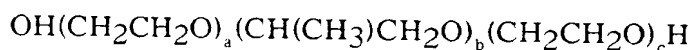
La présence d'un tel agent de surface non ionique en association avec les complexes
5 est avantageuse à plusieurs titres:

Selon l'invention, les agent(s) de transfection cationique(s) et acides nucléiques sont présents dans la composition dans un rapport de charge qui naturellement est propice au développement d'un phénomène d'aggrégation. Ceci sous-entend que les charges positives portées par le ou les agent(s) de transfection cationique(s) ne sont qu'en
10 léger excès comparativement aux charges négatives portées par l'acide nucléique complexé, voire au mieux les compensent totalement. Un tel rapport de charge est particulièrement avantageux sur le plan in vivo car moins préjudiciable en terme d'interaction avec le sérum ou autres protéines comme par exemple l'albumine et plus intéressant sur le plan innocuité. A titre illustratif, ce rapport de charge évolue de
15 préférence entre 1 et 6 et plus préférentiellement, il est inférieur à 4.

De plus, cet agent de surface est tout à fait compatible avec une administration in vivo. Dans le cas des formulations selon l'invention il n'est en effet pas nécessaire de procéder à une élimination de cet agent de surface non-ionique, préalablement à leur injection dans les cellules à traitées.

20 Enfin, les compositions selon l'invention peuvent être avantageusement stockées. La présence de l'agent de surface non ionique s'oppose efficacement à tout phénomène de précipitation au sein de ladite composition.

A titre d'agent de surface préféré selon l'invention on citera tout particulièrement le composé de formule générale :



avec a égal à 75, b à 30 et c à 75.

D'autres agents de surface non-ioniques préférés sont les polyéthylène glycol à tête polyéther benzylique dendritique, les polyoxyéthylène alcool, ou le polyoxyéthylène
5 nonylphényléther.

Par agent de transfection cationique on désigne de préférence selon l'invention les polymères cationiques et les lipofectants.

En ce qui concerne plus particulièrement les lipofectants, on entend couvrir au sens de l'invention, sous cette dénomination, tout composé ou mélange à caractère
10 lipidique et chargé positivement, déjà proposé à titre d'agent actif à l'égard de la transfection cellulaire d'acides nucléiques.

De manière générale, il s'agit de molécules amphiphiles comprenant au moins une région lipophile associée ou non à une région hydrophile.

A titre représentatif de la première famille de composés, on peut notamment proposer
15 des mélanges lipidiques susceptibles de former des liposomes cationiques. Ces formulations peuvent ainsi contenir du POPC, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, cholestérol, lipofectamine ou du maléimidophénylbutyryl-phosphatidyléthanolamine associé à un lipide cationique tel que défini ci-après.

Selon un mode particulier de l'invention, l'agent lipofectant mis en oeuvre possède
20 une région cationique.

A titre illustratif de ce type de lipides cationiques construits sur le modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer", on peut plus particulièrement citer le DOTMA et également ceux comprenant à titre

de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement ammonium quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les

5 DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement ammonium quaternaire.

Avantageusement, les lipofectants convenant à l'invention peuvent également être choisis parmi des lipopolyamines dont la région polyamine répond à la formule générale :



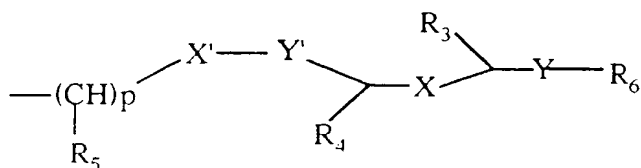
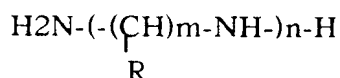
dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2 et n est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone compris entre 2 amines, cette région polyamine étant associée de manière covalente à une région lipophile de type chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, du cholestérol, ou

15 un lipide naturel ou synthétique capable de former des phases lamellaires ou hexagonales. Cette région polyamine est plus préférentiellement représentée par la spermine ou un de ses analogues ayant conservé ses propriétés de liaison à l'acide nucléique.

La demande de brevet EP 394 111 décrit des lipopolyamines de cette famille

20 susceptibles d'être mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention. A titre représentatif de ces lipopolyamines on peut plus particulièrement citer la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) et la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES).

Les lipopolyamines décrites dans la demande de brevet WO 96/17823 peuvent également être utilisées avantageusement selon l'invention. Elles sont représentées par la formule générale :

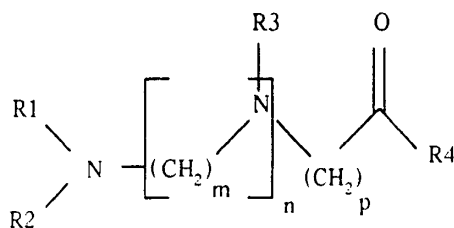


5 dans laquelle R représente

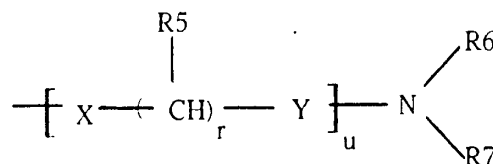
où X et X' représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'oxygène, un
groupe méthylène $-(\text{CH}_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupe amino
-NH- ou -NR'-, avec R' représentant un groupe alkyle en C₁ à C₄, Y et Y'
représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe méthylène, un
10 groupe carbonyle ou un groupe C=S, R₃, R₄ et R₅ représentent
indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué
ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5, R₆ représente un dérivé du
cholestérol ou un groupe dialkylamino -NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant
indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou
15 ramifié en C₁₂ à C₂₂.

A titre représentatif de ces lipopolyamines on peut tout particulièrement citer le
(Diocadécylcarbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle
et le (Diocadécylcarbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2-
propyle.

Enfin, plus récemment, de nouvelles lipopolyamines, valorisables également dans le cadre de la présente invention, ont été décrites dans la demande de brevet WO 97/18185. Il s'agit de composés de formule générale comme suit :



- 5 Dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(\text{CH}_2)_q\text{-NRR}'$ avec q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R_1 , R_2 et R_3 et R et R' représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(\text{CH}_2)_q\text{-NH}_2$, q' pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière
- 10 indépendante entre les différents groupements R et R' , m , n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6 avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R_3 des significations différentes au sein de la formule générale et R_4 représente un groupement de formule générale :

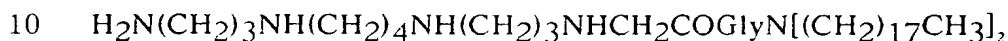
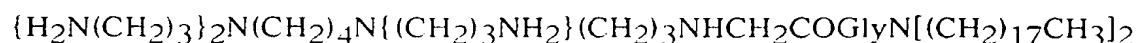


15

- dans laquelle R_6 et R_7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C_{10} à C_{22} avec au moins l'un des deux groupements différent de l'hydrogène, u est un nombre entier choisi entre 0 et 10 avec lorsque u est un entier supérieur à 1 R_5 , X , Y et r pouvant avoir des
- 20 significations différentes au sein des différents motifs $[\text{X}-(\text{CHR}_5)_r\text{-Y}]$, X représente

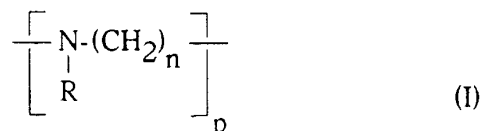
un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou non, Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène, R₅ représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide aminé naturel, le cas échéant substituée et r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R₅ 5 représentant une chaîne latérale d'acide aminé naturel substitué ou non et lorsque r est supérieur à 1, R₅ représentant un atome d'hydrogène.

A titre représentatif de ces lipopolyamines on peut plus particulièrement mentionner celles qui suivent :

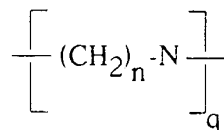


$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$ De manière particulièrement avantageuse, on peut utiliser dans le cadre de l'invention la lipofectamine, la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) la 5-carboxy-spermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES), le (dioctadécyl- 15 carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle, le (dioctadécylcarbamoylméthoxy)acétate de 1,3-bis-(3-aminopropylamino)-2-propyle, $\{H_2N(CH_2)_3\}_2N(CH_2)_4N\{(CH_2)_3NH_2\}(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$, le $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$, et/ou le $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$. Il peut 20 également s'agir de lipides cationiques incorporant un ou plusieurs groupements guanidinium et/ou amidinium, comme plus particulièrement ceux décrits par J.M. LEHN et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1996, 93, 9682-9686).

Selon la présente invention, le polymère cationique susceptible d'être mis en oeuvre à titre d'agent de transfection cationique est de préférence un composé de formule générale (I) comme suit :



5 dans laquelle R peut être un atome d'hydrogène ou un groupement de formule :



n étant un nombre entier compris entre 2 et 10, et p et q étant des nombres entiers, étant entendu que la somme p+q est telle que le poids moléculaire moyen du polymère est compris entre 100 et 10⁷ Da.

10 Il est entendu que, dans la formule (I) ci-dessus, la valeur de n peut varier entre les différents motifs p. Ainsi, la formule (I) regroupe à la fois les homopolymères et les hétéropolymères.

Plus préférentiellement, dans la formule (I), n est compris entre 2 et 5. En particulier, les polymères de polyéthylène imine (PEI) et de polypropylène imine (PPI)
 15 présentent des propriétés tout à fait avantageuses. Les polymères préférés pour la mise en oeuvre de la présente invention sont ceux dont le poids moléculaire est compris entre 10³ et 5.10⁶. A titre d'exemple, on peut citer le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 50 000 Da (PEI50K), le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 22 000 Da (PEI22K) ou le polyéthylène imine de poids
 20 moléculaire moyen 800 000 Da (PEI800K).

Les PEI50K, le PEI22K et le PEI800K sont accessibles commercialement. Quant aux autres polymères représentés par la formule générale (I), ils peuvent être préparés selon le procédé décrit dans la demande de brevet FR 94/08735.

Dans les compositions de la présente invention, l'acide nucléique complexé avec
5 l'agent de transfection cationique peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine
10 humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement.

15 Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonuléotides courts ou des séquences plus longues. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires,
20 etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement
25 exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce

cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant
5 une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus
10 particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 92/03120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc la dystrophine ou une minidystrophine (FR 91/11947), la
15 protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93/04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les gènes correspondant
20 aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de
25 transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore

un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger, etc.

L'acide nucléique thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de
5 gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN
10 cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements
15 immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus, d'autres virus ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

20 Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de
25 séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou

même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les

5 promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé

10 dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

15 Dans un autre mode de mise en oeuvre, les compositions revendiquées peuvent comprendre en outre un adjuvant de type dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les

20 cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Très récemment, la demanderesse a démontré qu'il était également particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjuvant dans des compositions transfectantes, un

25 composé intervenant, directement ou non, au niveau de la condensation d'acides

nucléiques. Ce composé est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Un tel agent peut également dériver d'une partie d'une histone, d'une nucléoline, d'une protamine et/ou de l'un de leurs dérivés (WO 96/25508). Un tel composé peut
5 être avantageusement incorporé dans la composition revendiquée.

Les compositions selon l'invention peuvent également mettre en oeuvre un ou plusieurs éléments de ciblage permettant de diriger les complexes nucléiques vers des récepteurs ou des ligands à la surface de la cellule. A titre d'exemple, la composition de la présente invention peut comprendre un ou plusieurs anticorps dirigés contre des
10 molécules de la surface cellulaire, ou encore un ou plusieurs ligands de récepteurs membranaires comme l'insuline, la transferrine, l'acide folique ou tout autre facteur de croissance, cytokines ou vitamines. Avantageusement, la composition peut utiliser des lectines, modifiées ou non, afin de cibler des polysaccharides particuliers à la surface de la cellule ou sur la matrice extracellulaire avoisinante. Des protéines à
15 motif RGD, des peptides contenant un tandem de motifs RGD, cyclique ou non, ainsi que des peptides polylysine peuvent ainsi être utilisés. Plus récemment, il a également été décrit des peptides ligands, naturels ou synthétiques, intéressants notamment pour leur sélectivité vis à vis de cellules spécifiques et capables de promouvoir efficacement l'internalisation au niveau de ces cellules. (Bary et al. Nature Medicine,
20 2, 1996, 299-305). Ces agents de ciblage sont généralement conjugués à l'agent de transfection cationique considéré.

La présente invention vise également un procédé de préparation des compositions revendiquées. Plus précisément, elle se rapporte à un procédé de préparation d'une composition comprenant des particules de complexes agent(s) de transfection
25 cationique(s)/acides nucléiques, stabilisées en taille, caractérisé en ce que l'agent

transfectant et l'acide nucléique sont mis en contact en présence d'une quantité suffisante en agent de surface non ionique pour stabiliser les particules de complexes nucléiques ainsi formées à une taille inférieure à environ 160 nm.

Plus précisément, l'un des composants à savoir l'acide nucléique ou le lipofectant est
5 au préalable mélangé à l'agent de surface non ionique avant d'être mis en présence avec le second composant. On prévient ainsi la manifestation de tout phénomène d'aggrégation qui spontanément se serait manifesté en absence dudit agent de surface non ionique.

Les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations
10 par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie
15 topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptés en fonction de différents paramètres,
20 et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus ou les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation in vivo, par injection ou greffe.

Les compositions selon l'invention sont particulièrement avantageuses sur le plan thérapeutique. On peut désormais envisager selon la présente invention d'administrer efficacement des complexes acides nucléiques de taille convenable et de rapport de charge réduit, ce qui est particulièrement bénéfique sur le plan *in vivo*. Les interactions
5 sérum/complexes nucléiques généralement observées sont avec les compositions revendiquées significativement atténuées.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

FIGURES

10 Figure 1: Effet du poloxalkol sur l'évolution de la taille des complexes RPR 120535/ADN, au rapport de charge (+/-) 2,5, en fonction du temps.

Figure 2 : Effet du poloxalkol sur l'évolution de la taille des complexes RPR 120531/ADN, au rapport de charge (+/-) 2,5 en fonction du temps.

Figure 3 : Effet du poloxalkol sur les associations RPR 120535/ADN.

15 Figure 4 : Effet du poloxalkol sur l'activité luciférase (RLU/5µl de lysat) des complexes RPR 120535/ADN, au rapport de charge (+/-) 2,5.

Figure 5 : PARTIE A : Représentation schématique de la structure des complexes RPR 120535/ADN en l'absence ou en présence de poloxalkol.

PARTIE B : Représentation schématique de la structure des complexes BGTC/ADN
20 en l'absence et en présence de poloxalkol

MATERIELS

L'agent de surface mis en oeuvre dans les exemples ci-après est le poloxalkol de formule $\text{OH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{75}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})_{30}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{75}\text{H}$. Il est commercialisé

sous la marque Pluronic F68[®]. La solution mère de poloxalkol mise en oeuvre dans les exemples qui suivent est à 10 % (poids/volume) dans l'eau.

L'ADN utilisé pour réaliser les échantillons est le plasmide de pXL2774 décrit dans le PCT/FR 96/01414. Il est utilisé à une concentration de 0,7 mg/ml dans un tampon

5 Tris/EDTA (10 mM/0,1 mM) de pH 7,5.

Les lipides cationiques utilisés sont les suivants :

$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$ (RPR 120535) (sel d'acétate) et $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{17}CH_3]$ (RPR 120531) (sel d'acide trifluoroacétique), tous deux décrits dans le PCT/FR

10 96/01774. Ils sont utilisés à une concentration de 5 mM dans de l'eau où ils sont solubilisés par chauffage à 50°C pendant 25 minutes, les solutions étant ensuite refroidies à température ambiante.

METHODES

La mesure du diamètre hydrodynamique est réalisée avec un Coulter N4Plus, en

15 utilisant des cuves plastiques (quatre faces transparentes) remplies avec 800 µl des différentes solutions, la mesure étant réalisée à 90°C en mode unimodale.

Les mesures de fluorescence sont réalisées sur Perkin Elmer LS50B, en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 260 nm et 590 nm. Les largeurs de fentes pour l'excitation et l'émission sont réglées à 5 nm. La valeur

20 de fluorescence est enregistrée après ajout de 5 µg de Bromure d'étidium/ml en concentration finale.

Les expériences de cryomicroscopie électronique à transmission (cryo-TEM) sont réalisées avec 7 µl d'échantillons préparés à 0,5 mg d'ADN/ml, qui sont disposés sur une grille en cuivre carbonée recouverte d'une membrane à trous. Les grilles sont

ensuite plongées dans de l'éthane liquide de manière à transformer l'eau liquide en eau vitreuse. Puis, cette grille est installée dans un porte-objet refroidi par de l'azote liquide, et on introduit dans le microscope (Philips CM12) pour visualisation.

Les expériences de diffusion de rayons X aux petits angles sont réalisées au
5 synchrotron (LURE) à Orsay (France) sur la ligne D43. Les échantillons sont préparés à 0,5 mg ADN/ml, puis centrifugés. Les culots sont disposés dans une cellule dont les deux fenêtres sont constituée de kapton. Un monochromateur au Germanium (111 réflexion) permet la sélection de la longueur d'onde de 0,138 nm.

Les transfections *in vivo* sont réalisées en injectant 200 µl, dans la veine de la queue de
10 souris âgées de 30 jours, d'une solution contenant 0,2 mg ADN/ml associé avec un vecteur lipidique cationique. 24 heures après l'injection, les souris sont euthanasiées, puis différents organes sont récupérés (poumon, foie, coeur, rein, rate). Ces organes sont ensuite broyés dans un tampon de lyse à l'aide d'un ultraturax. Les broyats obtenus sont ensuite centrifugés, puis 10 µl du surnageant est prélevé afin de doser
15 l'activité luciférase.

EXEMPLE 1 : Influence du poloxalkol sur la taille des complexes RPR 120535/ADN.

Le plasmide (10 µg/ml) est mis dans une solution contenant 150 mM de NaCl et différentes concentration en poloxalkol. Le lipofectant RPR 120535 est ensuite ajouté
20 pour obtenir un rapport de charge (+/-) 2,5. La taille des complexes est ensuite mesurée par spectroscopie de corrélation de photons selon le protocole décrit dans Méthodes. Les résultats sont présentés sur la figure 1.

On note qu'en absence de poloxalkol (\square), la taille des particules évolue de 274 nm jusqu'à un maximum de 1000 nm en quelques dizaine de minutes. Puis on observe un précipité après quelques heures d'incubation.

En revanche, en présence de 0,1 % (+) de poloxalkol, on observe une diminution de la taille des complexes, taille qui demeure stable pour une concentration de 0,8% (○) et 1 % (▲) de poloxalkol et n'évolue pas au delà de 150 nm.

L'incubation du lipofectant seul avec le poloxalkol à 1% (poids/volume) ne forme pas de particules détectables par Diffusion Quasi Elastique de la lumière. De même, lorsque l'ADN est incubé avec le poloxalkol à 1%, aucune particule ne peut être détectée.

EXEMPLE 2 : Influence de poloxalkol sur la taille des complexes RPR 120531/ADN.

Pour ce faire, l'exemple n°1 a été répété avec le lipide cationique RPR 120531.

Le plasmide (10 µg/ml) est mis dans une solution contenant 150 mM de NaCl à différentes concentration en poloxalkol. Le RPR 120531 est ensuite ajouté pour obtenir un rapport de de charge (+/-) 2,5. La taille des complexes est mesurée par spectroscopie de corrélation de photons (Coulter N4plus). Les résultats sont présentés sur la figure 2.

On note qu'en l'absence de poloxalkol, la taille des complexes RPR 120531/ADN évolue de 234 nm à 590 nm en quelques heures alors qu'elle demeure stable en présence de 0,5% (▲) et 0,9% (○) de poloxalkol.

EXEMPLE 3 : Contrôle du degré de compaction ADN/lipofectant en présence et en l'absence de poloxalkol.

Il a été vérifié que les particules obtenues en présence de poloxalkol étaient bien des particules issues de l'association de l'ADN avec le lipide cationique. A ces fins, des

expériences d'insertion d'une sonde, qui fluoresce lorsqu'elle est intercalée dans l'ADN ont été réalisées. Le niveau de fluorescence est important lorsque l'ADN est libre et en revanche faible lorsque celui-ci est inaccessible car compacté au lipide cationique. La figure 3 rend compte des résultats obtenus.

- 5 On observe les niveaux de fluorescence obtenus après association de l'ADN au lipide cationique en présence et en absence de poloxalkol. Tout d'abord on note que la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé à l'ADN n'est pas modifiée par la présence ou l'absence de 1% de poloxalkol. Les niveaux de fluorescence des complexes lipide cationique/ADN (rapport de charge (+/-) 2,5) en présence ou en
- 10 l'absence de 1% de poloxalkol sont en effet du même ordre. Cette valeur de fluorescence résiduelle indique que l'ADN n'est pas accessible pour la sonde.

En conclusion, le poloxalkol n'empêche donc pas l'association de l'ADN avec le lipide cationique de se faire normalement.

EXEMPLE 4 : Transfection *in vitro* avec de l'ADN ou du RPR 120535 contenant

- 15 **1% de poloxalkol.**

Nous avons voulu vérifier quel était l'effet du poloxalkol lorsqu'il était mélangé à de l'ADN seul ou à du lipide cationique seul. Pour cela les deux échantillons suivants ont été préparés :

- Echantillon 1 : 10 µg ADN/ml dans un milieu contenant 300 mM de NaCl et 1% (poids/volume) de poloxalkol.
- 20

Echantillon 2 : 60 µM de RPR 120535 dans un milieu contenant 300 mM de NaCl et 1% poloxalkol.

- Ces échantillons sont préparés en mélangeant dans l'ordre pour l'échantillon 1 : eau, NaCl, ADN et poloxalkol, et pour l'échantillon 2 : eau, NaCl, poloxalkol et RPR
- 25 120535 dans les quantités figurant dans le tableau I ci-dessous :

Essai	H ₂ O	NaCl (5 M)	ADN (0,7 mg/ml)	poloxalkol (10%)	RPR 120535 (5 mmol)
1 (µl)	413	30	7.1	50	0
2 (µl)	414	30	0	50	6

TABLEAU I

L'activité biologique de ces deux échantillons est testée sur des cellules NIH 3T3. Un volume de 50 µl des différents échantillons est déposé par puits sur plaque de 24 puits.

- 5 La transfection est réalisée en l'absence de sérum de veau foetal. Ce dernier est ajouté 2 heures après l'addition des complexes.

Les résultats indiquent qu'aucun transfert de gène n'est observé avec l'ADN non-complexé en présence de 1% de poloxalkol et en l'absence de 10% de sérum de veau foetal.

- 10 D'autre part le dosage des protéines totales démontre qu'il n'y a pas de toxicité apparente.

EXEMPLE 5 : Transfection *in vitro* avec des solutions de complexes lipofectant RPR 120535/ADN stabilisées à différentes concentrations en poloxalkol.

- On a cherché à apprécier l'incidence de la stabilisation des particules par le poloxalkol sur l'efficacité de transfection de ces particules en présence de poloxalkol.
- 15 Pour se faire, des échantillons contenant différentes concentrations en poloxalkol ont été préparés.

- Quatre échantillons de rapport de charge (+/-) 2,5 sont préparés dans un milieu contenant 300 mM de NaCl à différentes concentrations en poloxalkol (0; 0,5%;
- 20 0,8% et 1%; poids/volume) :

Echantillon 1 : rapport de charge (+/-) 2,5, 300 mM de NaCl.

Echantillon 2 : rapport de charge (+/-) 2,5, 300 mM de NaCl, et 0,5% de poloxalkol.

Echantillon 3 : rapport de charge (+/-) 2,5, 300 mM de NaCl, et 0,8% de poloxalkol.

Echantillon 4 : rapport de charge (+/-) 2,5, 300 mM de NaCl, et 1% de poloxalkol.

Ces échantillons ont été préparés en mélangeant dans l'ordre : eau, NaCl, ADN,

5 poloxalkol et RPR 120535, dans les quantités figurant en tableau II ci-dessous :

Essai	H ₂ O	NaCl (5 M)	ADN (0,7 mg/ml)	poloxalkol (10%)	RPR 120535 (5 mM)
1 (µl)	737	48	11,4	0	4
2 (µl)	697	48	11,4	40	4
3 (µl)	672	48	11,4	64	4
4 (µl)	657	48	11,4	80	4

TABLEAU II

* L'échantillon 1 appartient à une gamme de concentration en lipide cationique où il n'y a pas de stabilité des particules en solution, c'est-à-dire que les particules s'agrègent les unes aux autres pour former de larges paquets d'agrégats qui possèdent
10 des diamètres hydrodynamique important (supérieur à 1000 nm).

* L'échantillon 2 a le même rapport de charge lipide cationique/ADN que l'échantillon 1, mais le mélange est réalisé en présence de 0,5 % (poids/volume) de poloxalkol. Cependant cette concentration n'est pas suffisante pour assurer une stabilisation complète des particules (cf exemple n°1 : influence d'un polymère non-
15 ionique sur la taille des complexes RPR 120535/ADN).

* Les échantillons 3 et 4 sont stables, le diamètre hydrodynamique des particules restent aux alentours de 150 nm.

L'activité biologique des différentes formulations est testée sur des cellules NIH 3T3. Un volume de 50 µl des différents échantillons (à 10 µg ADN/ml) est ajouté par puits. La transfection est réalisée en l'absence de sérum de veau foetal. Ce dernier est ajouté 2 heures après l'addition des complexes. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.

On note en figure 4 que le poloxalkol, quelque soit sa concentration, n'altère pas la transfection *in vitro* des cellules NIH 3T3. Le poloxalkol ne modifie pas les propriétés de transfection en l'absence de sérum de veau foetal des complexes RPR 120535/ADN au rapport de charge (+/-) 2,5.

10 **EXEMPLE 6 : Détermination de la structure des complexes RPR 120535/ADN, BGTC/ADN, et BGTC/DOPE/ADN stabilisés par du poloxalkol.**

Dans cette étude, nous avons déterminé par diffusion de rayons X aux petits angles et par microscopie électronique à transmission la structure des complexes transfectant lipide cationique/ADN.

15 La figure 5A concerne les complexes RPR 120535/ADN. La structure obtenue en l'absence et en présence de poloxalkol est une structure lamellaire dans laquelle l'ADN est pris en sandwich entre des bicouches lipidiques dont la périodicité est de 8 nm. La présence de poloxalkol permet d'obtenir des complexes de petite taille, alors qu'en l'absence de poloxalkol, nous obtenons des précipités dont la taille est
20 supérieure à 1000 nm.

La figure 5B représente les structures obtenues avec le lipide cationique BGTC (décrit dans la demande de brevet WO 97/31935). Dans ce cas, nous obtenons également une structure lamellaire dont la périodicité est de 6,5 nm en présence ou en l'absence de poloxalkol. La présence de poloxalkol permet également dans ce cas de

disposer de complexes de petite taille. Les résultats sont obtenus invariablement pour des complexes contenant ou non l'adjuvant DOPE.

Nous pouvons donc en conclure que l'ajout d'un poloxalkol ne gêne pas l'association de l'ADN au lipide cationique, mais ne modifie que l'état colloïdal de ce complexe.

5 **EXEMPLE 7 : Transfection *in vivo* après injection systémique de complexes lipide cationique/ADN stabilisés par du poloxalkol.**

1) RPR 120535/ADN/F68[®]

Nous avons comparé les efficacités de transfert de gène après injections systémiques de complexes RPR 120535/ADN précipités, et de ces mêmes complexes stabilisés par l'addition de Pluronic F68[®]. Le tableau III ci-dessous indique que lorsque les complexes sont réalisés en l'absence de F68[®], on retrouve uniquement une expression dans les poumons. Par contre, lorsque les particules sont stabilisées colloïdalement par l'ajout de F68[®], l'activité luciférase est augmentée d'un facteur 10 dans les poumons, et on retrouve une expression dans d'autres tissus (foie, coeur).

Lipide	RPR 120535	
Formulation	0% de F68	10% de F68
Souris	balbc.	balbc
Poumons	2 ± 0,9	14 ± 0,9
foie	0	2 ± 3
Reins	0	0
Coeur	0	1 ± 0,4

2) BGTC/DOPE/ADN/F68[®]

Des expériences identiques à celles décrites ci-dessus ont été réalisées en utilisant un autre lipide : le BGTC. Des résultats similaires ont été obtenus, à savoir une amélioration du transfert de gène dans les poumons et une expression mesurable dans

5 le foie, le coeur, et les reins. Ces résultats ont été obtenus avec différentes races de souris (balbc, C57B16, et C57B16 déficientes en Apolipoprotéine E). Il est remarquable que des niveaux de transfection identiques soient obtenus avec des souris C57B16 normales ou déficientes en Apolipoprotéine E, car ces dernières possèdent un taux de lipide très important, c'est-à-dire dix fois plus qu'une souris

10 normale. En effet, étant donné que l'on utilise des vecteurs non-viraux lipidiques, on aurait pu s'attendre à ce que ces complexes soient déstabilisés par la présence de ces lipides endogènes en grande quantité. Les résultats de transfection *in vivo* de complexes BGTC/DOPE/ADN en l'absence ou en présence de poloxalkol sont rassemblés dans le tableau IV ci-dessous :

Lipide	BGTC/DOPE			
Formulation	0% F68	4% F68		
Souris	balbc	balbc	C57B16	C57B16 KoApoE
Poumons	6.7±2,8	86,5±65,4	220±99	201±12
foie	0	11,4±11,5	47±26	47±23
Reins	0	0,34±0,16	1,8±0,9	2,2±0,1
Coeur	0	0,74±1,05	0,73±0,7	0,6±0,0

EXEMPLE 8 : Utilisation d'autres agents de surface non-ioniques.

D'autres agents de surface non-ioniques ont été testés : dendrimère polyéthylène glycol, polyoxyéthylène alcool, polyoxyéthylène nonylphényléther. Ils montrent la même capacité que le F68® à stabiliser les complexes lipides cationiques/ADN. Le
5 lipide cationique avec lequel les études ont été réalisées est le RPR 120535.

1) dendrimères polyéthylène glycol

Nous avons utilisé un dendrimère possédant 1 tête de polyéther benzylique de génération 2 sur laquelle est greffé du polyéthylène glycol (PEG) de masse moléculaire 5000 Da (dénommé SAS11), et un autre dendrimère du même type, mais
10 contenant 2 têtes de polyéther benzylique greffées sur un PEG de masse 11 000 Da (dénommé SAS9). Le tableau IV ci-dessous indique qu'avec ces dendrimères, dès 0,02% (poids/volume), nous n'obtenons plus de précipité micronique de complexes transfectants, mais plutôt des particules de diamètre inférieur à ou de l'ordre de 100 nm.

15 2) polyoxyéthylène alcool

Ce produit encore dénommé "Brij" comportant 100 oxyéthylène pour la partie hydrophile, permet d'obtenir au bout d'1 heure des complexes RPR 120535/ADN d'un diamètre inférieur à 100 nm.

3) Polyoxyéthylène nonylphényléther

20 Ce produit permet aussi de stabiliser colloïdalement les complexes transfectants RPR 120535/ADN. Le diamètre des particules est également de l'ordre de 100 nm.

Le tableau V ci-dessous représente le diamètre, en nm, des complexes RPR 120535/ADN, au rapport de charge de 2,75 (+/-) à 0,25 mg d'ADN/ml dans 150 mM de NaCl, stabilisés par différents agents de surface non-ioniques.

Polymère (p/v)	0,05%	0,1%	0,2%
Brij 700	114 nm	69 nm	74 nm
SAS11	152 nm	99 nm	71 nm
SAS 9	104 nm	85 nm	75 nm
polyoxyéthylène nonylphényl éther	142 nm	132 nm	111 nm

TABLEAU V

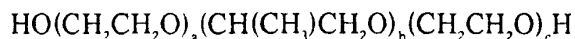
Pour l'ensemble des formulations stabilisées avec ces différents agents de surface non-ioniques, nous avons vérifié l'état de condensation de l'ADN avec le lipide cationique par des mesures de fluorescence. Les résultats ont indiqué que la présence

5 de ces surfactants à la surface des complexes lipide cationique/ADN ne modifie pas la condensation de l'ADN avec les lipides cationiques (résultats non-montrés).

REVENDICATIONS

1. Composition utile en thérapie génique comprenant des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques stabilisées caractérisée en ce qu'elle incorpore en outre au moins un agent de surface non ionique en quantité
5 suffisante pour stabiliser la taille desdites particules à une dimension inférieure ou égale à 160 nm.
2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique et l'acide nucléique y sont présents dans un rapport de charge compris entre 1 et 6.
- 10 3. Composition selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique et l'acide nucléique y sont présents dans un rapport de charge inférieur à 4.
4. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de surface comprend au moins un segment hydrophobe et au moins un
15 segment hydrophile.
5. Composition selon la revendication 4 caractérisée en ce que le segment hydrophobe est choisi parmi les chaînes aliphatiques, les polyoxyalkylènes, les polyesters d'alkylidène, les polyéthylène glycol à tête polyéther benzylique, et le cholestérol.
- 20 6. Composition selon la revendication 4 ou 5 caractérisée en ce que le segment hydrophile est choisi parmi les polyoxyalkylènes, les alcools polyvinyliques, les polyvinylpyrrolidones, ou les saccharides.

7. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de surface est un poloxalkylène de formule générale :



avec a, b et c représentant indépendamment l'un de l'autre des nombres entiers

5 pouvant varier entre 20 et 100.

8. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle contient à titre d'agent de surface un composé de formule générale $\text{OH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})_b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_c\text{H}$, avec a égal à 75, b à 30 et c à 75.

9. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle
10 contient à titre d'agent de surface un composé de la famille des polyéthylène glycol à tête polyéther benzylique dendritique.

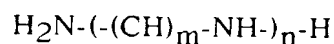
10. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle contient à titre d'agent de surface un composé de la famille des polyoxyéthylène alcool.

15 11. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle contient à titre d'agent de surface le polyoxyéthylène nonylphényléther.

12. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de surface y est présent à une concentration comprise entre 0,01% et 10% poids/volume de ladite composition.

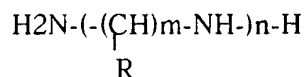
20 13. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de surface y est présent à une concentration comprise entre 0,02% et 5% poids/volume de ladite composition.

14. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique est un lipofectant.
15. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que le lipofectant est une molécule amphiphile comprenant au moins une région lipophile associée ou non
5 à une région hydrophile.
16. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un mélange lipidique susceptible de former des liposomes cationiques.
17. Composition selon la revendication 14 ou 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un lipide cationique.
- 10 18. Composition selon la revendication 14 ou 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un lipofectant comprenant au moins une région polyamine de formule générale :

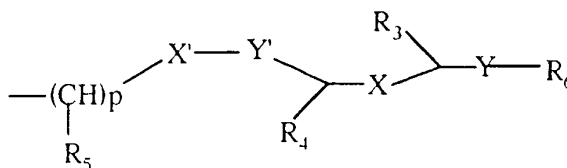


- dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2 et n est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone
15 compris entre 2 amines, associée de manière covalente à une région lipophile de type chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, du cholestérol, ou un lipide naturel ou synthétique capable de former des phases lamellaires ou hexagonales.
19. Composition selon la revendication 18 caractérisée en ce que la région polyamine est représentée par la spermine ou un de ses analogues ayant conservé ses propriétés
20 de liaison à l'acide nucléique.

20. Composition selon la revendication 14 ou 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un lipofectant de formule générale :



dans laquelle R figurant la région lipophile est représenté par la formule générale :

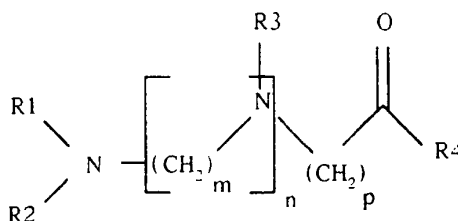


dans laquelle X et X' représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(\text{CH}_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino, $-\text{NH}-$ ou $-\text{NR}'-$ avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄, Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S, R₃, R₄ et R₅ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5, R₆ représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino $-\text{NR}_1\text{R}_2$ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂.

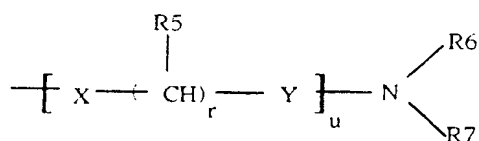
10

15

21. Composition selon la revendication 14 ou 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un lipofectant de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(CH_2)_q-NRR'$ avec q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R_1 , R_2 et R_3 , et R et R' représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(CH_2)_{q'}-NH_2$, q' pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R et R' , m , n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6 avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R_3 des significations différentes au sein de la formule générale précédente, et R_4 représente un groupement de formule générale :

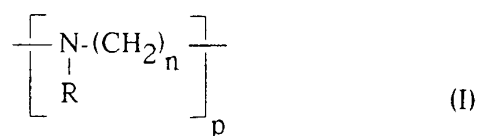


dans laquelle R_6 et R_7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C_{10} à C_{22} avec au moins l'un des deux groupements étant différent de l'hydrogène, u est un nombre entier choisi entre 0 et 10 avec lorsque u est un entier supérieur à 1, R_5 , X , Y et r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents motifs $[X-(CHR_5)_r-Y]$, X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou non, Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène, R_5 représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide aminé naturel, le cas échéant substituée, et r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R_5 représentant une chaîne latérale d'acide aminé naturel substitué ou non, et lorsque r est supérieur à 1, R_5 représentant un atome d'hydrogène.

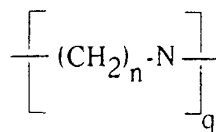
22. Composition selon l'une des revendications 14 ou 15 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un lipide cationique porteur d'un ou plusieurs groupements guanidinium et/ou amidinium.

23. Composition selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique est un polymère cationique.

24. Composition selon la revendication 23 caractérisée en ce que ledit polymère cationique est un composé de formule générale (I) :



dans laquelle R peut être un atome d'hydrogène ou un groupe de formule :



10

n est un nombre entier compris entre 2 et 10, et p et q sont des nombres entiers, étant entendu que la somme p+q est telle que le poids moléculaire moyen du polymère est compris entre 100 et 10^7 Da.

25. Composition selon la revendication 23 ou 24 caractérisée en ce qu'il s'agit du polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 50 000 Da (PEI50K), du polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 22 000 Da (PEI22K), ou le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 800 000 Da (PEI800K).

26. Composition selon l'une des revendications 1 à 14 caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique est de préférence choisi parmi la lipofectamine, la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE), le (Dioctadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle ou le (Dioctadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle, le $\{H_2N(CH_2)_3\}_2N(CH_2)_4N\{(CH_2)_3NH_2\}(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$, le $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$, et le $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$.
27. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.
28. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.
29. Composition selon la revendication 27 ou 28 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.
30. Composition selon l'une des revendications 1 à 26 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un antisens.
31. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.
32. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un adjuvant de type dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphos-phatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -

mirystoyl phosphatidyléthanamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides.

- 5 33. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle associe en outre à l'agent de transfection cationique un élément de ciblage.

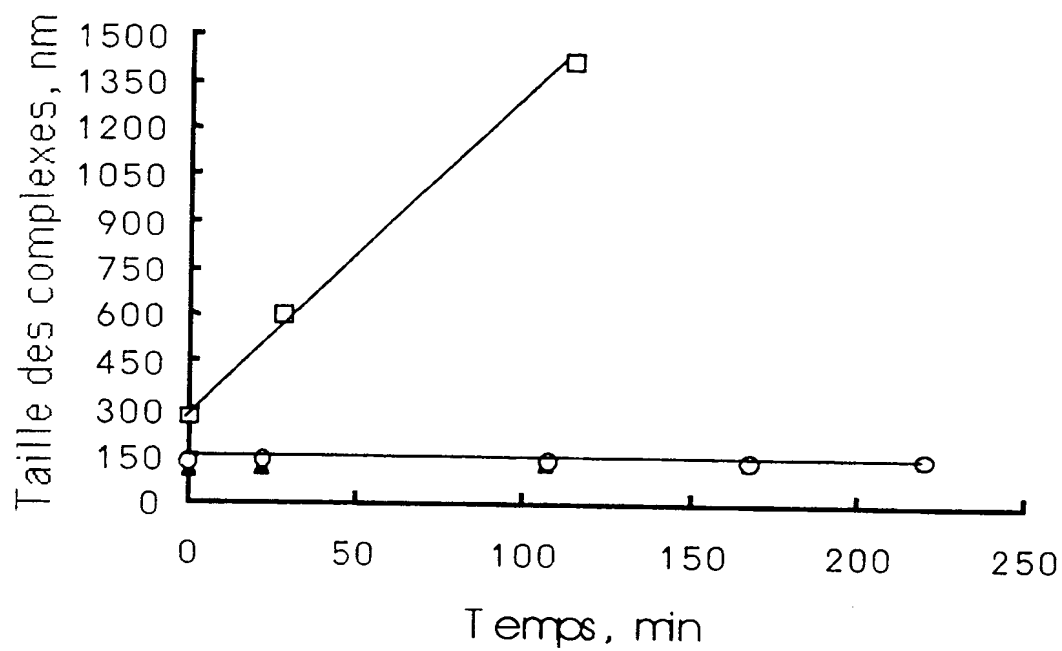
34. Composition selon la revendication 33 caractérisée en ce que cet élément de ciblage est choisi parmi les anticorps dirigés contre des molécules de la surface cellulaire, des ligands de récepteurs membranaires comme l'insuline, la
10 transferrine, l'acide folique ou tout autre facteur de croissance, cytokines ou vitamines, des lectines, modifiées ou non, des protéines à motif RGD, des peptides contenant un tandem de motifs RGD, cyclique ou non, des peptides polylysine ainsi que des peptides ligands naturels ou synthétiques.

35. Procédé de préparation d'une composition comprenant des particules de
15 complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques caractérisé en ce que l'agent transfectant et l'acide nucléique sont mis en contact, en présence d'une quantité suffisante d'un agent de surface non ionique pour stabiliser les particules de complexes nucléiques ainsi formées à une taille inférieure à environ 160 nm.

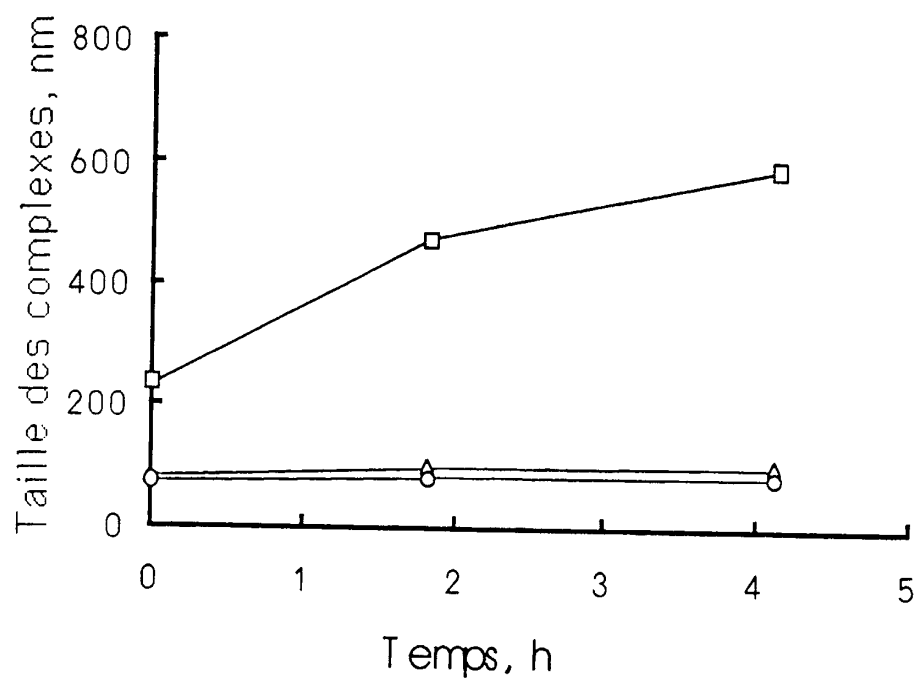
36. Procédé selon la revendication 35 caractérisé en ce que l'un des composants choisi
20 parmi l'acide nucléique ou le lipofectant est au préalable mélangé à l'agent de surface non ionique avant d'être mis en présence avec le second composant.

37. Procédé selon la revendication 35 ou 36 caractérisé en ce que l'agent de surface y est défini selon les revendications 4 à 13.

1/5

Figure 1

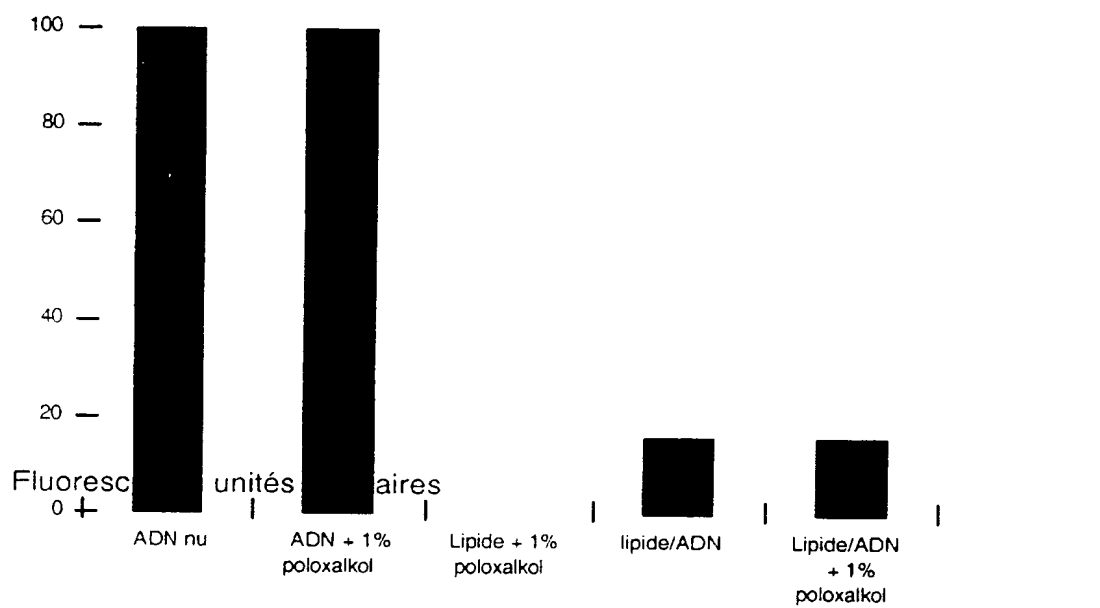
2/5



5

Figure 2

3/5



5

Figure 3

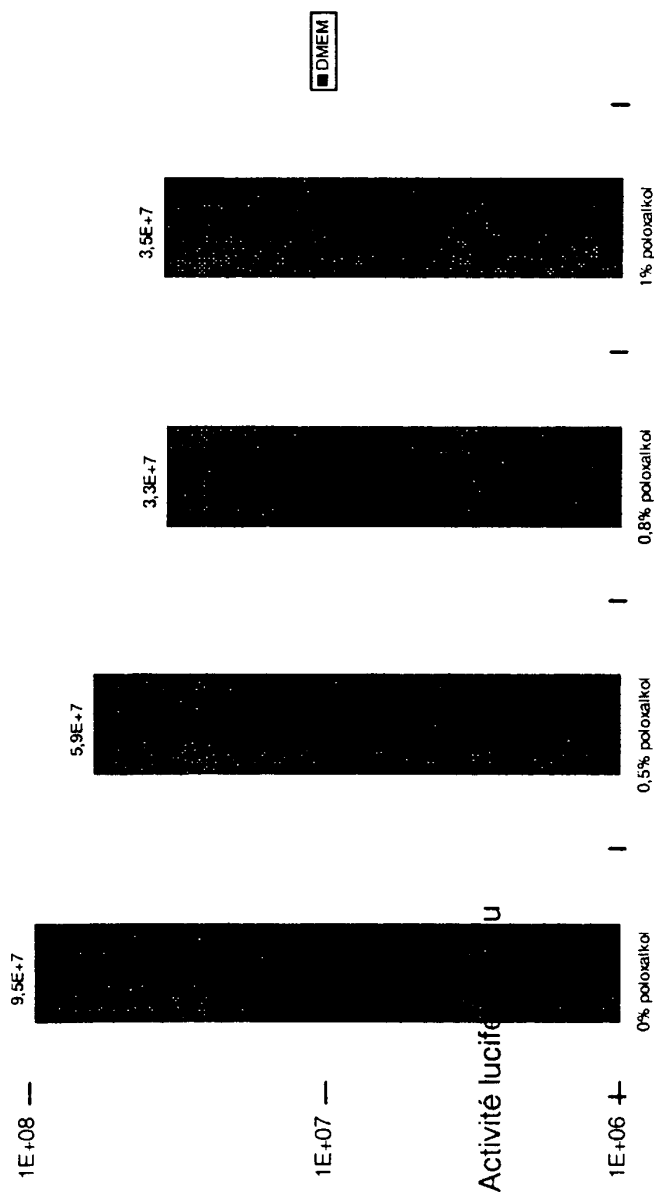


Figure 4

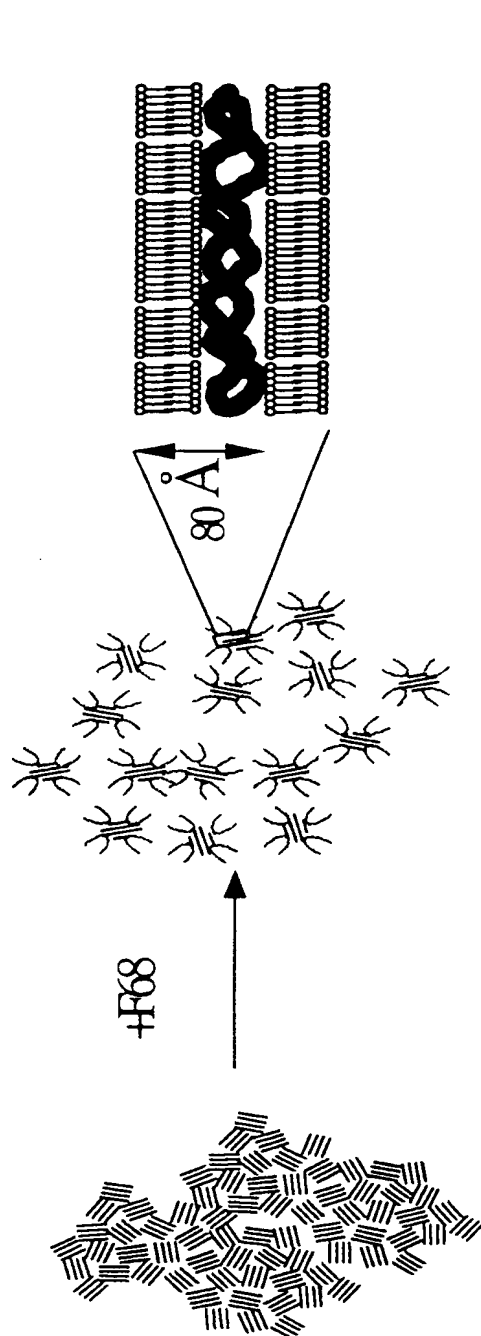


Figure 5A

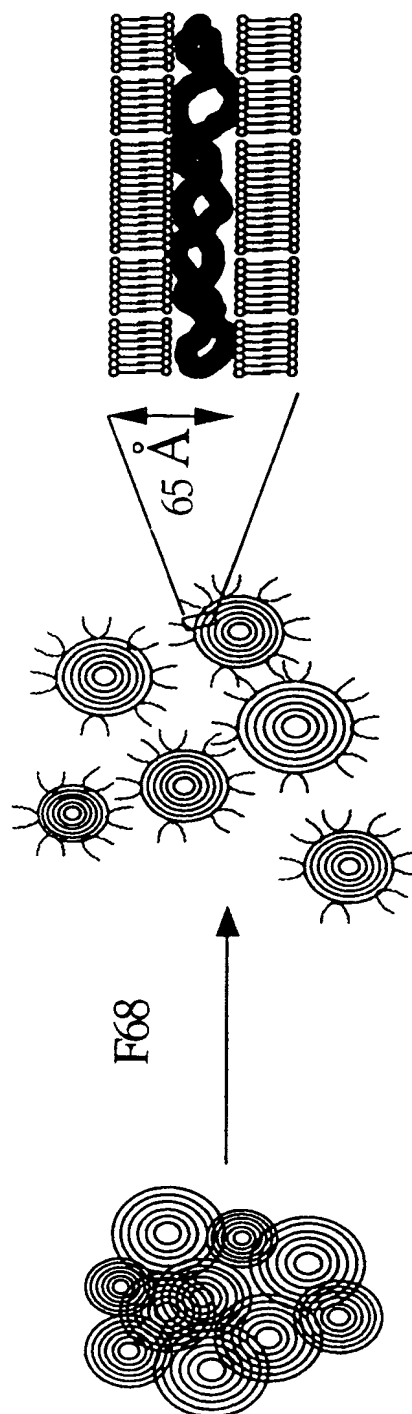


Figure 5B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.

FR 98/00222

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K48/00 A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU ET AL: "NEW CATIONIC LIPID FORMULATIONS FOR GENE TRANSFER" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 13, no. 12, 1996, pages 1856-1860, XP002045397 see the whole document ---	1-37
A	WO 96 04932 A (CYTRX CORP) 22 February 1996 see page 4, line 29 - page 8, line 14 see page 20, line 31 - page 21, line 34 ---	
A	WO 96 30051 A (GENETIC THERAPY INC ;CHILDRENS S HOSPITAL MEDICAL C (US); JOBE ALA) 3 October 1996 see page 8, paragraph 2 - paragraph 4 --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 June 1998

Date of mailing of the international search report

30/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00222

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	HARA ET AL: "EMULSION FORMULATIONS AS A VECTOR FOR GENE DELIVERY IN VITRO AND IN VIVO" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 24, no. 2 3, 17 March 1997, pages 265-271, XP002067903 see the whole document -----	1-37
P,X	WO 97 11682 A (UNIV PITTSBURGH) 3 April 1997 see the whole document -----	1-19,23, 26-32, 35-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 98/00222

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604932	A	22-02-1996	AU 3272495 A	07-03-1996
			CA 2196801 A	22-02-1996
			EP 0774974 A	28-05-1997
WO 9630051	A	03-10-1996	AU 5527696 A	16-10-1996
WO 9711682	A	03-04-1997	AU 7245896 A	17-04-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No

PCT/FR 98/00222

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K48/00 A61K9/127

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LIU ET AL: "NEW CATIONIC LIPID FORMULATIONS FOR GENE TRANSFER" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 13, no. 12, 1996, pages 1856-1860, XP002045397 voir le document en entier ---	1-37
A	WO 96 04932 A (CYTRX CORP) 22 février 1996 voir page 4, ligne 29 - page 8, ligne 14 voir page 20, ligne 31 - page 21, ligne 34 ---	
A	WO 96 30051 A (GENETIC THERAPY INC ; CHILDRENS S HOSPITAL MEDICAL C (US); JOBE ALA) 3 octobre 1996 voir page 8, alinéa 2 - alinéa 4 --- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

" Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 juin 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/06/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Code Internationale No

/FR 98/00222

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,A	HARA ET AL: "EMULSION FORMULATIONS AS A VECTOR FOR GENE DELIVERY IN VITRO AND IN VIVO" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 24, no. 2 3, 17 mars 1997, pages 265-271, XP002067903 voir le document en entier ---	1-37
P,X	WO 97 11682 A (UNIV PITTSBURGH) 3 avril 1997 voir le document en entier -----	1-19, 23, 26-32, 35-37

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Recherche internationale No

PCT/FR 98/00222

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9604932 A	22-02-1996	AU 3272495 A CA 2196801 A EP 0774974 A	07-03-1996 22-02-1996 28-05-1997
WO 9630051 A	03-10-1996	AU 5527696 A	16-10-1996
WO 9711682 A	03-04-1997	AU 7245896 A	17-04-1997